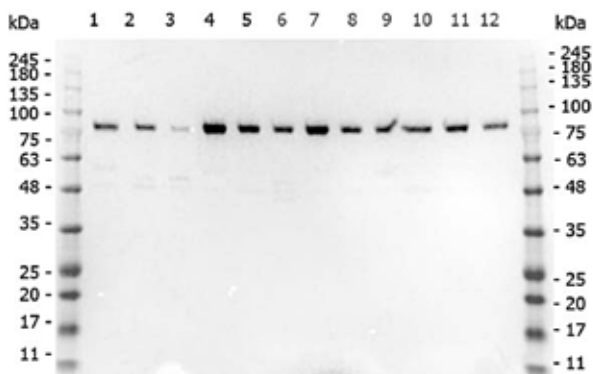


# ウェスタンブロット 手順書



## Contents

サンプル準備（細胞ライセート）.....	p. 2
電気泳動 .....	p. 4
ウェスタンブロット .....	p. 8
FAQ .....	p. 12



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

## サンプル準備（細胞ライセート）

1. 適切な培地で細胞を培養する
2. 培地を除き、PBS ですすぐ
3. PBS を除く
4. 0.5 mL の RIPA lysis buffer、または SDS-PAGE sample buffer (2x) を  $1 \times 10^7$  cells (※) に加え、氷上で 5 分間静置する  
※ 100 mm プレート、または 75 cm<sup>2</sup> フラスコでコンフルエント程度
5. セルスクレーパー等で細胞を剥がし、チューブに移す。この時氷上で保管する
6. 氷上でサンプル毎に 20 秒間隔で 7 秒ずつ 2 回、50 W パルスを使用して超音波処理により細胞を破碎し、DNA を切断する
7. 4℃、15,000 × *g* で 10 ~ 15 分間遠心分離する
8. 細胞ライセート（目的タンパク質を含む上清）を新しいチューブに回収する
9. RIPA Lysis Buffer を使用した場合、各サンプルのタンパク質濃度を測定する  
(各サンプルのタンパク質濃度を把握する事で、サンプル間のタンパク質量を比較できるようにする)

### Note

細胞ライセート回収後、一旦操作を止める場合は、サンプルを -70℃ で保管する



## RIPA Lysis Buffer (MB0030-0050)

- 50 mM Tris HCl
- 150 mM NaCl
- 1.0% (v/v) NP-40
- 0.5% (w/v) Sodium Deoxycholate
- 1.0 mM EDTA
- 0.1% (w/v) SDS
- 0.01% (w/v) sodium azide
- pH 7.4

※ Protease inhibitor および Phosphatase inhibitor は含まれません。必要に応じて、使用前に Protease/Phosphatase inhibitor(s) を添加してください。

Rockland Immunochemicals, Inc. メーカー略号: RKL

品名	包装	品番	希望販売価格
<b>UltraPure Sterile Water</b>			
	1 L	MB-009-1000	¥13,000
<b>10x PBS pH 7.2</b> (0.2 M Potassium Phosphate 1.5 M Sodium Chloride)			
	1 L	MB-008	¥20,000
<b>1x RIPA Lysis Buffer</b>			
	50 mL	MB-030-0050	¥20,000
<b>2x SDS-PAGE Sample Buffer without DTT or β-MeOH</b> (125 mM Tris, 20% Glycerol, 4% SDS, 0.01% bromophenol blue, pH 6.8)			
	100 mL	MB-018	¥20,000

## 電気泳動 (SDS-PAGE)

1. サンプルを滅菌水で適切な濃度に調製し、等量の 2x サンプルバッファーを加える。必要に応じて還元剤 (β-ME、DTT または TCEP 等) を加える

---

2. 95°C で 5 分間煮沸する

---

3. 3 分間遠心分離する

---

4. ゲルの濃度を決定し、電気泳動装置を準備する

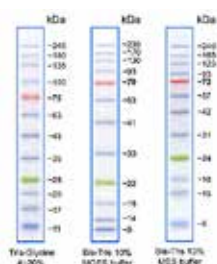
---

5. 1 レーンあたり 10 ~ 35 μg のライセート (精製タンパク質の場合、50 ~ 100 ng / レーン) をロードする。あわせて 5 μL のタンパク質分子量マーカーをロードする

---

6. 45 ~ 90 分間電気泳動する (120 ~ 150 V)

---

Opal Prestained Protein Standard  
 10-245kDa (MB-210-0500)

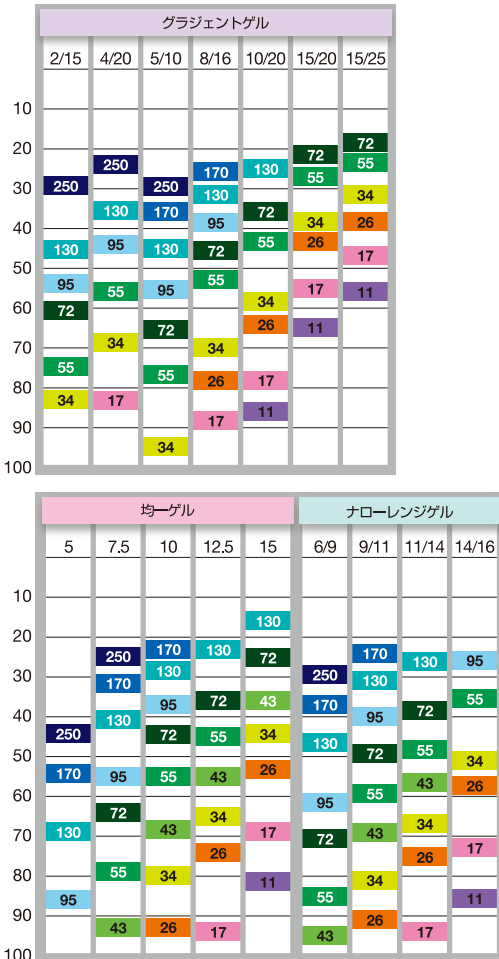
Rockland Immunochemicals, Inc. メーカー略号: RKL

品名	包装	品番	希望販売価格
<b>10x SDS-PAGE Running Gel Buffer</b> (0.25 M Tris, 1.92 M Glycine, 1.0% SDS pH 8.3)			
	1 L	MB-017	¥22,000
<b>10x Tris-Glycine</b>			
	1 L	MB-029-1000	¥17,000
<b>Opal Prestained Protein Standard 10-245kDa</b>			
	500 μL	MB-210-0500	¥46,000
<b>Opal Prestained Protein Standard 10-180kDa</b>			
	500 μL	MB-209-0500	¥46,000

## Note

ゲルの濃度は目的タンパク質の分子量で決定する  
100～500kDa の場合、4～8% のゲルを用いる  
10～100kDa の場合、4～20% のゲルを用いる  
分子量未知の場合、広範囲（4～20% 等）の  
グラジエントゲルがオススメ

マルチゲル® IIミニ 泳動パターン例



## 電気泳動用プレキャストポリアクリルアミドゲル マルチゲル® II



ゲルサイズ (mm) :  
85 (W) x 90 (L) x 0.9 (t)

プレート外寸 (mm) :  
100 (W) x 100 (L) x 3.1 (t)

包装 : 5 枚  
希望販売価格 : ¥9,800

ウェル数	最大	推奨
13 ウェル	25 $\mu$ L	10 $\mu$ L 以下
17 ウェル	15 $\mu$ L	10 $\mu$ L 以下

コスモ・バイオ株式会社 メーカー略号: DCB

品名	品番	ウェル数	ゲル濃度	分子量 (kDa)			
				3	4	10	15
グラフィエント	Multi Gel II mini 2/15	414855	13	2 ~ 15%			30 ~
		414862	17				
	Multi Gel II mini 4/20	414879	13	4 ~ 20%	15 ~ 250kDa		
		414886	17				
	Multi Gel II mini 5/10	441776	13	5 ~ 10%			
		443114	17				
	Multi Gel II mini 8/16	417269	13	8 ~ 16%			20 ~ 200
		417276	17				
	Multi Gel II mini 10/20	414893	13	10 ~ 20%			
		414909	17				
Multi Gel II mini 2D-10/20	415074	1	10 ~ 20%				
均一ゲル	Multi Gel II mini 5	443138	13	5%			
		443145	17				
	Multi Gel II mini 7.5	414930	13	7.5%			
		414947	17				
	Multi Gel II mini 10	414954	13	10%			30
		414961	17				
Multi Gel II mini 12.5	414978	13	12.5%			20 ~ 150	
	414985	17					
Multi Gel II mini 15	443152	13	15%				
	443169	17					
ナローレンジ	Multi Gel II mini 6/9	414992	13	6 ~ 9%			
		415005	17				
	Multi Gel II mini 9/11	415012	13	9 ~ 11%			30 ~ 2
		415029	17				
	Multi Gel II mini 11/14	415036	13	11 ~ 14%			20 ~ 150
		415043	17				
Multi Gel II mini 14/16	415050	13	14 ~ 16%			15 ~ 100kDa	
	415067	17					

## Laemmli 法準拠

タンパク質分離に最適な pH 条件により低分子領域までシャープなバンドを実現！

### ● 均一ゲル (5%、7.5%、10%、12.5%、15%)

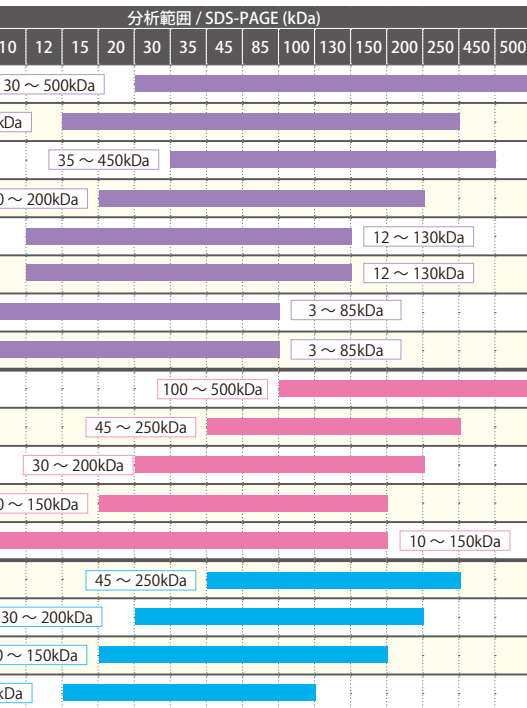
目的タンパク質の分子量既知の場合、  
分子量によりゲル濃度を選択  
分子量大→低濃度、分子量小→高濃度

### ● グラジェントゲル

急な濃度勾配を付けていて、分子量未知のタンパク質や、  
分子量広範囲にタンパク質を分離したい場合にオススメ

### ● ナローレンジゲル

緩やかな濃度勾配を付けていて、目的タンパク質の分子量  
付近をより分離したい場合にオススメ



記事 ID : 5329



## ウェスタンブロット

1. 0.2  $\mu\text{m}$  または 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレン（ニトロセルロースまたは PVDF）にタンパク質を転写する
2. ブロッキングバッファーによりメンブレンをブロッキングする  
(室温で 30 分間、オービタルシェイカーで振とうする)
3. メンブレンを滅菌水ですすぎ、一次抗体を反応させる。  
(4 度で一晩、5 ~ 10 mL の抗体を含むブロッキングバッファーに浸し、振とうする)
4. メンブレンを 5 ~ 10 mL の TTBS で 5 分間、2 回洗浄し、TBS ですすぐ
5. 標識付き二次抗体を反応させる  
(室温 30 分間、5 ~ 10 mL の抗体を含むブロッキングバッファーに浸し、振とうする)
6. メンブレンを 5 ~ 10 mL の TTBS で 5 分間、2 回洗浄し、TBS ですすぐ
7. 基質を加えて検出する



### Western incubation box, small (2 7/8"x2"x1 3/16") (WIB-2875-010)

光退色の影響を受けやすい蛍光標識抗体 (DyLight、IRDye など) を使用したウェスタンブロットに最適なインキュベーションボックスです。

Small (2.5 mL – 10 mL) と Large (10 mL – 30 mL) の 2 サイズをご用意しております。



Rockland Immunochemicals, Inc. メーカー略号: RKL

品名	包装	品番	希望販売価格
<b>BlockOut® - Universal Blocking Buffer</b>			
	500 mL	MB-073	¥40,000
<b>Bovine Serum Albumin - Fraction V</b> (Immunoglobulin And Protease Free)			
	50 g	BSA-50	¥28,000
<b>10x TTBS pH 7.5</b> (1.0 M Tris HCl 1.5 M Sodium Chloride 0.1% (v/v) Tween-20)			
	1 L	MB-013	¥22,000
<b>1x TBS pH 7.8</b> (0.1M Tris HCl 0.15M Sodium Chloride)			
	1 L	MB-069-1000	¥13,000
<b>TMB Membrane Peroxidase Substrate</b>			
	100 mL	TMBM-100	¥28,000
	1 L	TMBM-1000	¥57,000
<b>Chemiluminescent FemtoMax™ Super Sensitive HRP Substrate</b>			
	20 mL	FEMTOMAX-020	¥30,000
	110 mL	FEMTOMAX-110	¥97,000
<b>Western incubation box, small</b> (2 7/8" x 2" x 1 3/16") for 2.5mL - 10mL			
	1 each (10 box)	WIB-2875-010	¥17,000
<b>Western incubation box, large</b> (4 5/8" x 3 1/2" x 1 1/8") for 10mL - 30mL			
	1 each (5 box)	WIB-4625-005	¥17,000

## ウェスタンブロット用 一次抗体なら Rockland 社にお任せ！



1962年に設立された Rockland Immunochemicals 社は、機能ゲノミクスや遺伝子治療、創薬分野における基礎研究や臨床研究のための最先端の研究用ツールを製造、販売する世界的なバイオテクノロジー企業です。米国ペンシルバニア州フィラデルフィアにほど近いエリアに抗体やタンパク質製造の拠点を有し、各国にはりめぐらされた代理店網により世界中の研究者の皆様をサポートしています。

**Rockland Immunochemicals 社ホームページ**

<https://rockland-inc.com>

**Rockland Immunochemicals 社**

**ウェスタンブロットプロトコル (動画)**



Pick up

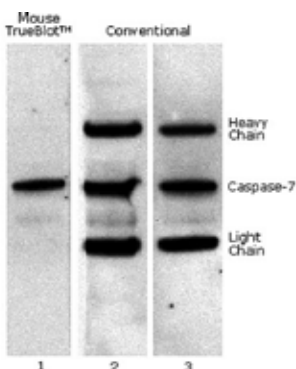
免疫沈降 / ウェスタンブロットで  
困っていませんか？

## 免疫沈降 / ウェスタンブロット用試薬

TrueBlot<sup>®</sup>

詳細は web へ 記事 ID: 10334

TrueBlot<sup>®</sup> は、IgG の未変性ジスルフィド型を優先的に検出するため、免疫沈降した抗体の H 鎖と L 鎖による干渉を抑えることができます。



### TrueBlot<sup>®</sup> を用いた IP/ ウェスタンブロット

Jurkat 細胞ライセートをマウス抗ヒトカスパーゼ7抗体で免疫沈降し、マウス抗ヒトカスパーゼ7抗体と TrueBlot<sup>®</sup>、または HRP 標識二次抗体 (Conventional) によりウェスタンブロットを行った。

### 詳しい情報はコスモ・バイオ Web サイトへ

コスモ・バイオ Web サイトトップページ「記事 ID 検索」に、記事 ID で示された数字を入力して検索してください。ダイレクトにページへ行くことができます。

記事 ID 検索 : 10334

www.cosmobio.co.jp

サイト内検索 商品検索 品番検索 記事ID検索

entry\_id :

※半角数字でご入力ください。

## FAQ

### Q.1 目的タンパク質の検出にはどのぐらいの一次抗体が必要ですか

**A.1** 一般的には 1  $\mu\text{g}$  の目的タンパク質、10  $\mu\text{g}$  の細胞ライセート（目的タンパク質を含む）に対し、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗体があれば検出可能です。

※ 細胞ライセートを用いる場合、タンパク質発現量にも依存しますので、使用量と抗体量をご検討ください。

### Q.2 ブロッキングバッファーは何がおすすめですか

**A.2** スキムミルクや BSA を含むブロッキングバッファー、正常血清等がよくブロッキングに使われています。抗体との非特異的な相互作用という観点から言うと正常血清が適していると言えるでしょう。

### Q.3 同じ抗体を用いていますが、目的タンパク質が他のアプリケーションでは検出されるのに対し、ウェスタンブロットでは検出されません

**A.3** 非変性条件での電気泳動をご検討ください。タンパク質が変性条件下で分離（電気泳動）された場合、非変性条件では検出できるエピトープが認識されない場合があります。

### Q.4 困ったときは？

**A.4** Always use Rockland brand antibodies and reagents for best results!



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

取扱店

お問い合わせ / 注意事項

記載の社名・商品名等の名称は、弊社または各社の商標または登録商標です。

**希望販売価格** 記載の希望販売価格は 2020 年 10 月 1 日現在の価格で、予告なく改定される場合があります。また、「希望販売価格」「キャンペーン中の参考価格」は参考価格であり、販売店様からの実際の販売価格ではございません。ご注文の際には販売店様へご確認くださいようお願い申し上げます。表示価格に消費税は含まれておりません。

**使用範囲** 記載の商品およびサービスは全て、「研究用」です。人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。